AMEA-nın Xəbərləri (biologiya və tibb elmləri), cild 69, №1, səh. 60-65 (2014)

Влияние Экспериментального Нефтяного Загрязнения на Кровь Сазана

Х.М. Сафиханова*, Р.Ю. Касимов, Э.К. Рустамов

Институт физиологии им. А.И. Караева НАНА, ул. Шариф-заде, 2, Баку AZ1100, Азербайджан;
**E-mail: namik.s@mail.ru*

В работе на примере куринского сазана показано, что в результате воздействия сырой нефти концентрацией 100мг/л в мазках крови увеличивается процентное соотношение незрелых эритроцитов. Обнаружено возрастание числа анизацитозных и пойкилоцитозных клеток, эритроцитов с патологическими изменениями морфологической организации. В данном исследовании также установлено процентное отношение различных лейкоцитов, которое показало лимфоцитарный характер крови этих рыб.

Ключевые слова: *нефтяное загрязнение, сазан, кровь, эритроциты, лейкоциты*

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что неблагополучное состояние водной среды, в том числе и загрязнение нефтью, вызывает различные нарушения морфологической организации клеток крови рыб (Кузина, 2010; Кузина, 2011; Alkindi et al., 2005; Cavas et al., 2003). В работах, посвящённых воздействию нефти, а также её производных показаны значительные патологические изменения строения эритроцитов у различных видов рыб (Аленичев, 2002; Кармазин, 2010; Al-Ayed, 2001; Vanzella, 2007). Нарушения морфологической организации эритроцитов ведёт к угнетению, а в некоторых случаях и к невозможности их функционирования, и прежде всего, газообмена в этих клетках (Бугаев и др., 2007). Следует отметить, что концентрация сырой нефти и время её воздействия, существенно влияют на степень, вызываемых ею патологических изменений в морфологии этих клеток. Так опыты, проведённые на карпах (*Cyprinus carpio* L.) в экспозициях с сырой нефтью демонстрируют эту зависимость в динамике появления различных патологий – базофилия цитоплазмы, пикноз ядер и агглютинация эритроцитов (Каниева, 2002).

Исследование воздействия сырой нефти было изучено и на примере пресноводной рыбы – ореохромиса (*Oreochromis niloticus*), которое также выявило дозозависимое действие этого вещества (Al-Ayed, 2001).

Воздействие различных нефтепродуктов на рыб также вызывает нарушения морфологической организации эритроцитов. Так, на примере прохилода (*Prochilodus lineatus*) показано, что водорастворимая фракция дизельного топлива является причиной увеличения числа эритроцитов периферической крови рыб, имеющих патологические отклонения строения их ядер (Vanzella, 2007).

Целью нашего исследования было изучение влияния сырой нефти концентрацией 100 мг/л на строение форменных элементов крови куринского сазана (*Cyprinus carpio*) .

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте использовалась 6-месячная молодь сазана (*Cyprinus carpio*) весом 35,1-44,6 г, длиной 21,6-27,1 см. Рыбы были взяты с Хыллинского рыбоводного завода, расположенного в Нефтчалинском районе (Азербайджан). Экспериментальная часть работы проводилась в условиях Института физиологии. Среднесуточная температура воды в ваннах, где содержались подопытные рыбы, составляла 22-24ºС. Концентрация сырой нефти (месторождение «Нефтяные Камни») была 100 мг/л. Взятие материала проводилось на 5, 10 и 15 сутки.

В каждый из вышеуказанных дней у исследуемых рыб бралась кровь методом отсечения хвостового плавника и на предметных стёклах готовились мазки. После их просушивания проводилась фиксация этиловым спиртом в течение 5 мин. Просушенные фиксированные мазки окрашивались азур-эозиновым краси-телем, используя общепринятый метод Романовского. Окрашенные мазки крови промывались дистиллированной водой. Изучение мазков крови проводилось под световым микроскопом NU2 (Carl Zeiss, Jena). Процентное соотношение патологических эритроцитов вычислялось из расчёта на 1000 эритроцитов. В работе также представлено процентное соотношение различных типов лейкоцитов (процентное соотношение их зрелых и незрелых форм, а также гранулоцитов и агранулоцитов), которое определялось путём их подсчёта исходя из 200 клеток. Фотографирование производилось при помощи цифровой камеры Canon G-9.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование мазков крови контрольной группы рыб показало, что их эритроциты овальной формы. В центре этих клеток находится продолговатое ядро фиолетового цвета. Цитоплазма эритроцитов представлена широкой полосой розоватого цвета вокруг ядра. Каких-либо ярко-выраженных отклонений в строении красных кровяных клеток не отмечено. В мазках крови встречаются как незрелые, так и эритроциты, имеющие различные патологические изменения их морфологической организации, но в процентном соотношении их количество незначительно.

Так, процентное соотношение незрелых форм эритроцитов к зрелым формам составляет лишь 0,1%.

В мазках крови рыб обнаружены анизацитозные эритроциты (разноразмерные клетки), процентное соотношение которых равняется 1% от общего числа красных кровяных клеток.

Обнаруженные в настоящей работе пойкилоцитозные клетки (отличающиеся по форме эритроциты) составляют 1% от всех эритроцитов. Процентное соотношение эритроцитов, имеющих на поверхности выступы или шипы - 0,01%.

Отношение обнаруженных фестончатых эритроцитов, имеющих складчатую форму поверхности, было незначительно и составляло лишь 0,01%. Эритроциты, имеющие разрушение клеточной оболочки, составляли 0,03%. В работе показано присутствие в мазках крови распавшихся на отдельные фрагменты эритроцитов (их цитолиз). Их процентное соотношение не превышает 0,2%.

Исследование крови выявляет следующую пропорцию соотношения лейкоцитов или лейкоцитарную формулу: бластные формы – 1%, промиелоциты – 3%, миелоциты - 5%, метамиелоциты – 2%, палочкоядерные нейтрофилы – 3%, сегментоядерные нейтрофилы – 1%, лимфоциты – 85%.

Воздействие сырой нефти концентрацией 100мг/л демонстрирует увеличение процентного соотношения незрелых, а также патологических эритроцитов к общему числу этих клеток, в зависимости от продолжительности времени экспозиции (5, 10, 15 дней). Так, процентное соотношение незрелых форм эритроцитов увеличивается на 5-ый день исследования и составляет 0,2%, на 10-ый день – 0,3%, на 15-ый день - 0,4% (Рис.1).

Процентное соотношение анизацитозных эритроцитов показывает прогрессивное их увеличение, и на 5-ый, 10-ый и 15-ый день эксперимента оно равняется 2%, 3% и 8%, соответственно (Рис.2).

Процентное соотношение, обнаруженных в ходе нашей работы, пойкилоцитозных эритроцитов на 5-ый день исследований составляет 1%, на 10-ый - 2%, а на 15-ый день – 5 % (Рис.3).

Процентное соотношение эритроцитов, имеющих выступы на поверхности клеточной мембраны, на 5-ый день экспозиции составляет 0,2%, на 10-ый день воздействия оно равняется 0,4%, а на 15-ый день увеличивается до 0,6% от остальных эритроцитов (Рис.4).

Отмечается тенденция увеличения числа фестончатых эритроцитов в зависимости от продолжительности воздействия вышеуказанной концентрации сырой нефти. Процентное соотношение фестончатых эритроцитов на 5-ый, 10-ый и 15-ый дни равняется соответственно 0,02%, 0,03% и 0,04% от общего числа эритроцитов (Рис.5).

В мазках крови присутствуют эритроциты с такой необратимой патологией клеточной организации, как нарушение целостности клеточных оболочек, ведущей к их разрушению. Число эритроцитов с разрушенными клеточными оболочками на 5-ый день экспозиции значительно увеличивается и составляет 0,05%, на 10-ый день - 0,1%, на 15-ый – 0,5%.

Отмеченные в данной экспозиции гипохромные эритроциты (были обнаружены клетки с просветлёнными участками цитоплазмы) на 5-ый, 10-ый и 15-ый день воздействия сырой нефти составляют 0,01%, 0,03% и 0,08% к общему числу эритроцитов. Следует отметить, что на 10-ый день воздействия указанного токсиканта в мазках крови рыб обнаружены эритроциты с такой патологией как смещение их ядер. Процентное соотношение таких эритроцитов составляет 0,01%. На 15-ый день наблюдается увеличение процентного соотношения подобных эритроцитов до 0,03% (Рис.6). В ходе исследования лишь на 15-ый день экспозиции в эритроцитах обнаружены процессы хроматинолиза и кариолиза. Процентное отношение эритроцитов с данными видамипатологий ядра к общему числу этих клеток на 5-ый день эксперимента не превышает 0,01%.

В мазках крови рыб на 10-ый день эксперимента встречаются двуядерные и безъядерные эритроциты. Также обнаружено простое деление красных кровяных клеток – амитоз (Рис.7).

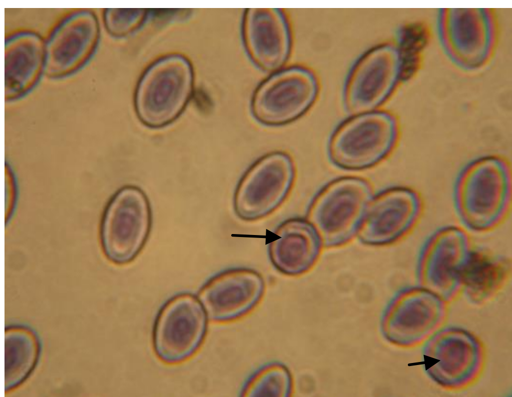


Рис. 1. Незрелые формы эритроцитов (X 1250)

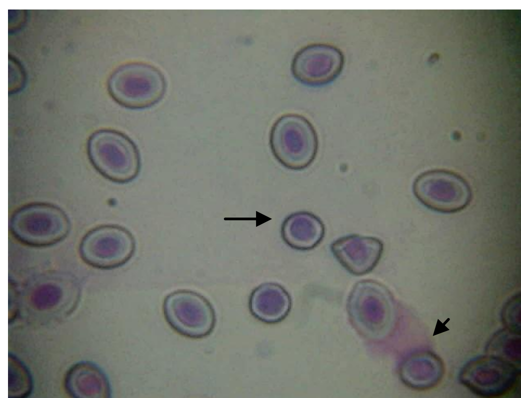


Рис. 2. Анизацитоз (X 2000)

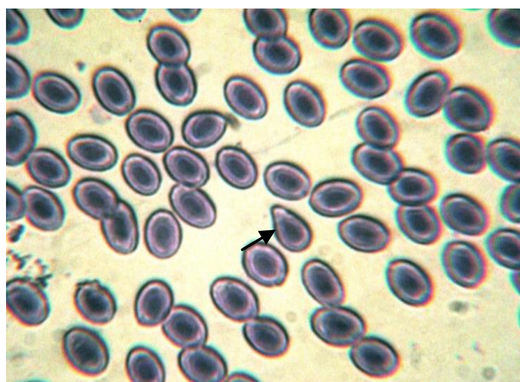


Рис. 3. Пойкилоцитоз (X 1250)



Рис. 4. Выступы на оболочке эритроцитов (X 2000)

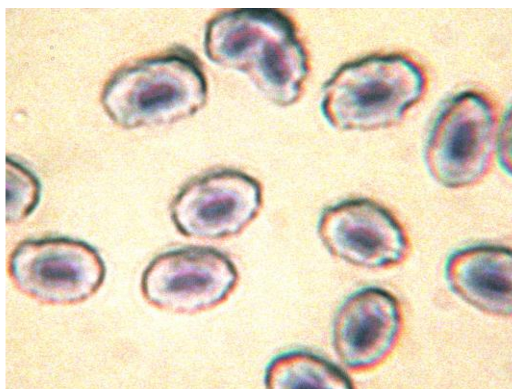


Рис. 5. Фестончатые эритроциты (X 3000)



Рис. 6. Смещение ядер эритроцитов (X 4000)



Рис. 7. Амитоз эритроцитов (X 3000)



Рис. 8. Разрушение эритроцитов (X 2000)

На долю этих клеток (безъядерных, двуядерных и находящихся в состоянии деления) приходилось 0,01% от общего числа эритроцитов. На 15-ый день эксперимента отмечается увеличение этого параметра до 0,02%. Также проведённое исследование показывает тенденцию увеличения числа разрушенных эритроцитов, так как в мазках крови рыб присутствуют фрагменты распада эритроцитов (Рис.8). Процентное соотношение этих клеток на 5-ый день эксперимента составляет 0,4%, а на 10-ый и 15-ый дни – 0,7% и 1%, соответственно.

На 5-ый день эксперимента процентное соотношение лейкоцитов в мазках крови рыб имеет следующие значения: бластные формы – 1%, промиелоциты – 3%, миелоциты - 5%, метамиелоциты – 2%, палочкоядерные нейтрофилы – 3%, сегментоядерные нейтрофилы – 1%, лимфоциты – 85%. На 10-ый день нашего исследования происходит лишь незначительное увеличение процентного соотношения лимфоцитов до 86% и уменьшение отношения палочкоядерных нейтрофилов до 2%. На 15-ый день лейкоформула крови представлена следующим образом: бластные формы – 1%, промиелоциты – 2%, миелоциты - 4%, метамиелоциты – 3%, палочкоядерные нейтрофилы – 2%, сегментоядерные нейтрофилы – 1%, лимфоциты – 87%.

Как видно из вышеприведённых данных, имеющее место на протяжении всей экспозиции увеличение отношения незрелых эритроцитов к их общему числу, указывает на приспособительную реакцию рыб в ответ на распад эритроцитов в результате воздействия сырой нефти. Увеличение числа незрелых эритроцитов объясняется тем, что данное воздействие оказывает стрессовый эффект на живые организмы (Afaf, 2009; Rios et al., 2005). Следует отметить, что пропорция незрелых эритроцитов по отношению к их зрелым формам в мазках крови рыб может быть рассмотрена в качестве индикатора состояния окружающей среды (Rios et al., 2005).

Встречающиеся в настоящем исследовании в мазках крови эритроциты разного размера (анизацитоз) могут указывать на функциональную недостаточность кроветворных органов, и относятся к дегенеративным процессам, которые проявляются при различных формах анемии (Бугаев и др., 2007).

Обнаруженное в ходе исследования увеличение числа пойкилоцитов (эритроцитов разной формы), следует рассматривать как компенсаторное явление, способствующее увеличению поверхности эритроцита, участвующей в обмене веществ (Katalay and Parlak, 2004.). Предпо-лагается также, что пойкилоцитоз проявляется вследствие того, что клетки теряют свою эластичность и свидетельствует о дегенеративном состоянии кроветворения при угнетении эритропоэза (Бугаев и др., 2007).

Отмеченные, в работе деструктивные измнения эритроцитов, наблюдаемые на внешней оболочке, в их цитоплазме и ядре, могут свидетельствовать о степени нарушения внутриклеточного обмена этих клеток (Иванова, 1983).

Деформация эритроцитов крови находит своё отражение в целом ряде работ, посвящённых изучению воздействия различных поллютантов - цинка, меди, свинца, кадмия, фосфата дихромата, полихлоринатного нафталина и т.д. на различные виды рыб (Бугаев и др., 2007; Поморцева и др., 2010; Gwozdzinski K., 2011; Katalay and Parlak, 2004; Kori-Siakpere et al., 2008; Serezli et al., 2011).

Наличие, выявленных в настоящем исследовании гипохромных эритроцитов, многими авторами рассматривается как признак анемии, который возникает под действием различных токсических веществ, в том числе сырой нефти (Бугаев и др., 2007; Бугаев и др., 2010; Дворецкий, 2002). Преобладание в мазках крови контрольных и экспериментальных рыб лимфоцитов над всеми другими типами лейкоцитов указывает на то, что у куринского сазана как и у других видов рыб кровь имеет лимфоцитарный характер (Иванова, 1983).

Таким образом, анализ полученных результатов показал, что продление времени воздействия сырой нефти концентрацией 100мг/л вызывает увеличение процентного соотношения эритроцитов, имеющих различные патологические проявления их морфологической организации. Нарушения строения красных кровяных клеток, как известно, в конечном счёте, оказывают пагубное воздействие на весь организм в целом. Данные параметры, в виду своей информативности о состоянии клетки, являющейся структурной единицей всего организма, могут быть использованы как критерий оценки загрязнённости окружающей среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Аленичев С.В. (2002) Картина крови рыб при отравлении нефтепродуктами. Современные проблемы водной токсикологии. Матер. конф. (Борок): 28-29.

Бугаев Л.А., Зинчук О.А., Смыр Т.М., Жердев Н.А., Нагорная Ю.В. (2007) Токсикологическая характеристика промысловых рыб Азовского моря при пестицидной интоксикации. Ихтиологические исследования на внутренних водоёмах. Матер. конф. (Саранск): 73-74.

Бугаев Л.А., Рудницкая О.А, Сергеева С.Г., Засядько А.С. (2010) Использование гематологических показателей для оценки функционального состояния производителей судака. Основы охраны природы **34(2)**: 64-65

Дворецкий Л.И. (2002) Гипохромные анемии. Consilium Medicum **3(9)**: 87-91.

Иванова Н.Т. (1983) Атлас клеток крови рыб: 286с.

Каниева Н.А. (2002) Изменение гематологических показателей у рыб в зависимости от уровня сублетальных концентраций нефти. Современные проблемы Каспия. Материалы международной конференции: 130-132.

Кармазин А.П. (2010) Биомониторинг нефтяного загрязнения устья реки Дон с использованием водных позвоночных: Автореф. дис. канд.биол.наук. (Краснодар): 22с.

Кузина Т.В. (2010) Образование микроядер в эритроцитах промысловых рыб Волго-Каспийского канала Естественные науки **4(2):** стр.124-129.

Кузина Т.В. (2011) Цитофизиологические особенности крови промысловых рыб Волго-Каспийского канала. Автореф. дис. канд.биол.наук. (Астрахань): 25с.

Поморцева Н.А., Родионова Н.К., Гудков Д.И. (2010) Нарушения ядер эритроцитов периферической крови у рыб чернобыльской зоны отчуждения. Экологические проблемы XXI века. Матер. конф: 230-231.

Afaf M. Hafez. (2009) Mugil cephalus genome: A sensitive monitor for genotoxicity and cytotoxicity in aquatic environment. Australian journal of Basic and applied sciences, **3(3):** 2176-2187.

Al-Ayed M.I. (2001) Effekt of crude oil on some hematological parameters of the freshwater fishes Oreochromis nilotikus. Saudi J. Biol. Sci.: 26-39.

Alkindi A., Brown J.A., Waring C., Collins J. (2005) Endocrine, osmoregulatory, respiratory and hematological parameters in flounder exposed to the water soluble fraction of crude oil. Journal of Fish Biology: 361-366.

Cavas T., Ergene-Gzukara S. (2003) Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells. Mutation research, **534:** 93-99.

Gwozdzinski K. (2011) Structural changes of proteins in fish red blood cells after copper and mercury treatment. Archives of environmental contamination and toxicology, **23:** 426-430.

Katalay S., Parlak H. (2004) The effect of cadmium on erythrocyte structure of black goby (Gobius niger., 1758). E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences, **21:** 99-102.

Kori-Siakpere, Ovie and Ubogu, Ewoma Oghoghene. (2008) Sublethal haematological effects of zinc on the freshwater fish, Heteroclarias sp. (Osteichthyes: Clariidae). African Journal of Biotechnology, **7 (12):** 2068-2073.

Rios F.S., Oba E.T., Fernandes M.N., Kalinin A.L. and Rantin F.T. (2005) Erythrocyte senescence and hematological changes induced by starvation in the neotropical fish traira, Hoplias malabarikus. Comparative Biochemistry and Physiology – Part A: Molecular and Integrative Physiology: 281-287.

Serezli R., Akhan S. and Delihasan-Sonay F. (2011) Acute effects of copper and lead on some blood parameters on Coruh Trout (Salmo coruhensis). African Journal of Biotechnology, **10 (16):** 3204-3209.

Vanzella T.P., Martinez C.B.R., Colus I.M.S. (2007) Genotoxic and -mutageniceffectsss of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. Mutation research, **631:** 36-43.

Eksperimental Neft Çirklənmənin Çəki Balığının Qanına Təsiri

X.M. Səfixanova, R.Y. Qasımov, E.K. Rüstəmov

AMEA A.İ. Qarayev adına Fiziologiya İnstitutu

Təqdim olunan işdə 100 mq/l qatılıqlı xam neftin təsiri zamanı kür çəki balıqlarının qan yaxmalarında yetişməmiş eritrositlərin çoxalması müəyyən olunub. Eyni zamanda müxtəliv növ ölçü və formada olan hüceyrələrin və patoloji eritrositlərin çoxalması təyin olunub. Eksperiment zamanı balıqların qan yaxmalarında limfositlər faiz nisbətinə görə çoxluq təşkil edir.

Açar sözlər: *qan, eritrositlər, leykositlər, sazan, neft çirklənməsi*

Effect of the Experimental Oil Pollution on the Carp's Blood

Kh.M. Safikhanova, R.Y. Kasimov, E.K. Rustamov

Institute of Physiology named after A.İ.Garayev, ANAS

Percentage of immature red blood cells increased in the carp blood smears after impact of the crude oil (100 mg/l). The number of anisocytosis, poikilocytosis and red blood cells with pathological changes in the morphological arrangements also increased. Percentage of different leucocytes showed also lymphocytic character of the blood of this fish.

Key words: *oil pollution, carp, blood, erythrocytes, leukocytes*